Aus der Kinderklinik der Städtischen Krankenanstalten
in Braunschweig
Direktor: Prof. Dr. J. Oehme

Ein Beitrag zum Elektrophorese-Mobilitäts-(EM-) Test

Eine klinische und methodenkritische Untersuchung

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

DIETER HEFKE
aus Ostenburg

Marburg 1979

Aus der Kinderklinik der Städtischen Krankenanstalten
in Braunschweig
Direktor: Prof. Dr. J. Oehme

EIN BEITRAG ZUM ELEKTROPHORESE-MOBILITÄTS-(EM-)TEST

EINE KLINISCHE UND METHODENKRITISCHE UNTERSUCHUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

DIETER HEFKE
aus Ostenburg

Marburg 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan:	Prof. Dr. F. N e u r a t h
Referent:	Prof. Dr. J. O e h m e
Correferent:	Prof. Dr. H a v e m a n n

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A: EINLEITUNG 1

B: HAUPTTEIL

1. Untersuchte Personen 4

2. Methodik 5
   a) Erforderliche Medien 5
   b) Blutentnahme 8
   c) Lymphocytenisolierung 8
   d) Zytopherometer 10
   e) Messung im Zytopherometer 11

3. Ergebnisse 13
   a) Lymphocytenzahlen aufgrund des Differentialblutbildes 13
   b) Durchschnittliche Lymphocytenausbeute bei Gradientenzentrifugation mit Ficoll - Triosil in Relation zu der durch das Differentialblutbild zu erwartenden Lymphocytenzahl 13
   c) Reinheit der durch Gradientenzentrifugation gewonnenen Lymphocytenpopulation 15
   d) Vitalität der Lymphocyten 16
   e) Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit von tannierten und sulfosalicylsäurestabilisierten Hammelerythrocyten (E T S) im elektrischen Feld bei verschiedenen Inkubationszeiten von Lymphocyten mit dem "Encephalitogenen Faktor" (E F) 17
   f) Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit von tannierten und sulfosalicylsäurestabilisierten Hammelerythrocyten (E T S) im elektrischen Feld von der mit dem "Encephalitogenen Faktor" (E F) inkubierten Lymphocytenzahl 18

Seite

g) Wanderungsverhalten der tannierten und sulfosalicylsäurestabilisierten Hammelerythrocyten (E T S) im Zytopherometer 19

α) Nullstandards (Leerwerte) bei Handstoppung und bei halbelektronischer Messung 19

β) Wanderungsverhalten der tannierten und sulfosalicylsäurestabilisierten Hammelerythrocyten (E T S) einer einzelnen Probe 19

4. Diskussion 20

a) Methodik 20

α) Blutentnahme 20

β) Isolierung der Lymphocyten 21

γ) Optimale Inkubationszeit der Lymphocyten mit dem "Encephalitogenen Faktor" (E F) 25

δ) Optimale Konzentration des "Encephalitogenen Faktors" (E F) 26

ε) Optimale Lymphocytenzahl 27

ζ) Probleme des Zytopherometers 27

η) Nullstandard 30

ϑ) Wanderungsverhalten der tannierten und sulfosalicylsäurestabilisierten Hammelerythrocyten (E T S) im Zytopherometer 31

b) Biochemische und immunologische Grundlagen 33

c) Bisherige Ergebnisse mit dem E M - Test 36

C: Z U S A M M E N F A S S U N G 41

D: Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen, Literaturnachweis, Tabellen und Abbildungen 45

A: E I N L E I T U N G

T - Lymphocyten, die mit einem spezifischem Antigen sensibilisiert werden, setzen bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen eine Reihe von löslichen Substanzen frei, die als Mediatorsubstanzen (Lymphokinine) bezeichnet zelluläre Immunreaktionen steuern.

Als Mediatorsubstanzen wurden bisher nachgewiesen: a) Chemotaktische Faktoren b) Proliferationshemmende Faktoren c) Hautreaktionsfaktoren d) Blasto- und mitogene Faktoren e) Zytotoxische Faktoren (Lymphotoxine) f) Transferfaktor g) Makrophagenaktivierungsfaktor (M A F) h) Makrophageninhibitionsfaktor (M I F).

Die physikochemische Charakterisierung dieser Substanzen liegt allerdings noch in den Anfängen, da sie nur in kleinsten Mengen produziert und sezerniert werden und damit nur indirekt nachweisbar sind.

Da die Auffassung besteht, daß auch tumorassoziierte Antigene die gleichen Reaktionen bei den T - Lymphocyten auslösen, wurden mehrere Versuche durchgeführt, immunologische Methoden zur Diagnostik maligner Erkrankungen zu entwickeln.

1970 beschrieben FIELD und CASPARY (17) einen Faktor, der von T- Lymphocyten von Patienten mit malignen Erkrankungen nach Inkubation mit einem basischen Protein aus menschlichem Gehirn (Encephalitogener Faktor = EF) freigesetzt wird und die elektrophoretische Beweglichkeit von Meerschweinchenmakrophagen hemmt. Das gleiche Phänomen wurde bei Verwendung eines basischen Proteins aus menschlichem Tumorgewebe (Cancer Basic Protein = CaBP) beobachtet (18).

Die für die Hemmung verantwortliche Mediatorsubstanz wurde als Makrophagen - Slowing Factor (M S F) bezeichnet; der Test wurde Makrophagen - Elektrophorese-Mobilitäts - (M E M-) Test genannt. M S F wurde von den T- Lymphocyten gesunder Kontrollpersonen nicht freigesetzt. Eine Ausnahme bildeten degenerative neurologische Erkrankungen (17).

Mit dem M E M - Test konnten mehrere Autoren gute Ergebnisse erzielen (5,24,28,29,30,35,39,40); andere konnten dies jedoch nicht bestätigen (1,7,21,22,23, 27, 36).

Es fanden sich eine Reihe von großen technischen Problemen, so bei der Gewinnung einer Meerschweinchenmakrophagenpopulation, die man mehrere Tage nach Paraffininjektion in die Bauchhöhle der Meerschweinchen erhielt. Diese Zellpopulation enthielt Makrophagen von verschiedener Größe, verschieden stark mit Oeltröpfchen beladen, sowie bis zu 20% Lymphocyten, Granulocyten und Monocyten. Es bedurfte einer großen Erfahrung, um eine definierte Population von Makrophagen in Bezug auf Größe und phagocytierter Oelmenge zu finden, um eine exakte Bestimmung der elektrophoretischen Beweglichkeit dieser Zellen durchzuführen.

Wegen dieser erheblichen technischen Probleme verwendeten PORZSOLT und Mitarb. 1975 tannierte und sulfosalicylsäurestabilisierte Hammelerythrocyten (E T S) als Indikatorzellen (32).

Gegenüber der Verwendung von Makrophagen als Indikatorzellen haben E T S einige wichtige Vorteile:

Die Methode ist standardisiert; E T S kann in großen Mengen hergestellt werden und bleibt über lange Zeit stabil, da es sich um tote Zellen handelt.

Die Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld ist wesentlich einfacher durchzuführen, da E T S eine uniforme Population in Bezug auf Größe, Wanderungsverhalten als auch im Hinblick auf ihre Suszeptibilität für Mediatorsubstanzen darstellt.

Mit diesem Elektrophorese - Mobilitäts - (E M-) Test konnte PORZSOLT (32) eindeutig maligne von nicht malignen Erkrankungen unterscheiden.

Die Ergebnisse mit diesem Test konnten von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt werden (11,12,13, 14,16,25,26,31,37,41,42).

Eine von SHENTON 1977 durchgeführte Vergleichsstudie zeigte eine gute Korrelation des E M - zum M E M - Test (40).

In letzter Zeit führten mehrere Arbeitsgruppen den Elektrophorese - Mobilitäts - Test auch bei Kindern durch (25,26,31,37,41,42,43).

In unserer Klinik wird der Test seit November 1976 durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit ist es, an Hand eigener Erfahrungen und der Literatur auf die Problematik dieses Tests einzugehen.

Dabei sollen besonders kritische Angaben zur Methodik und ihre Vergleichbarkeit gemacht werden.

B: HAUPTTEIL

1. Untersuchte Personen

Wir führten von November 1976 bis Dezember 1978 insgesamt 264 E M - Tests bei 187 Patienten durch. Diese teilten sich folgendermaßen auf:

	Anzahl	Messungen
Gesunde Personen (8 Erwachsene, 29 Kinder)	37	57
Patienten mit nicht malignen Erkrankungen (nur Kinder)	90	93
Patienten mit malignen Erkrankungen (2 Erwachsene, 58 Kinder)	60	114

Von den 60 Patienten mit malignen Erkrankungen standen 40 (66,7%) unter immunsuppressiver Therapie.

Altersverteilung

Unter 2 Jahre	1,9 %
2 - 6 Jahre	34,0 %
7 -10 Jahre	36,8 %
über 10 Jahre	27,3 %

Der E M - Test wurde also überwiegend bei Kindern durchgeführt (94,8%).
Nur 1,9% aller Kinder waren im Alter unter zwei Jahren. Das liegt wohl größtenteils daran, daß maligne Erkrankungen im Kindesalter meist erst nach dem zweiten Lebensjahr auftreten.

2. Methodik

a) Erforderliche Medien

Trennmedium Ficoll - Triosil, Dichtegradient
9,556 g Ficoll + 130,4 ml Aqua dest.
+ 20 ml Urografin 76 % (Schering, Berlin)
+ 50 mg Natriumacid
Das spezifische Gewicht beträgt 1077

Hank's gepufferte Salzlösung
(Hank's buffered salt solution = HBSS)
Medium mit gepufferten Salzen (pH 7,2), hergestellt in den Flow - Laboratories, Bonn.

Medium 199
modifiziert mit Hank's Salzen, pH 7,2
+ 20 mMol Hepes Puffer
+ 100 mg/1 L - Glutamin
ohne Natriumbicarbonat
hergestellt in den Flow Laboratories, Bonn
Den beiden letztgenannten Medien sind pH - Indikatoren zugesetzt.

Encephalitogener Faktor (E F) [1)]
0,3 mg/ml Medium 199, steril filtriert

Tannierte und sulfosalicylsäurestabilisierte Hammelerythrocyten (E T S)[1)]
5 x 10^7 Erythrocyten/ml H B S S

1) Frdl. überreicht von Prof. Dr. AX, Behringwerke Marburg/Lahn

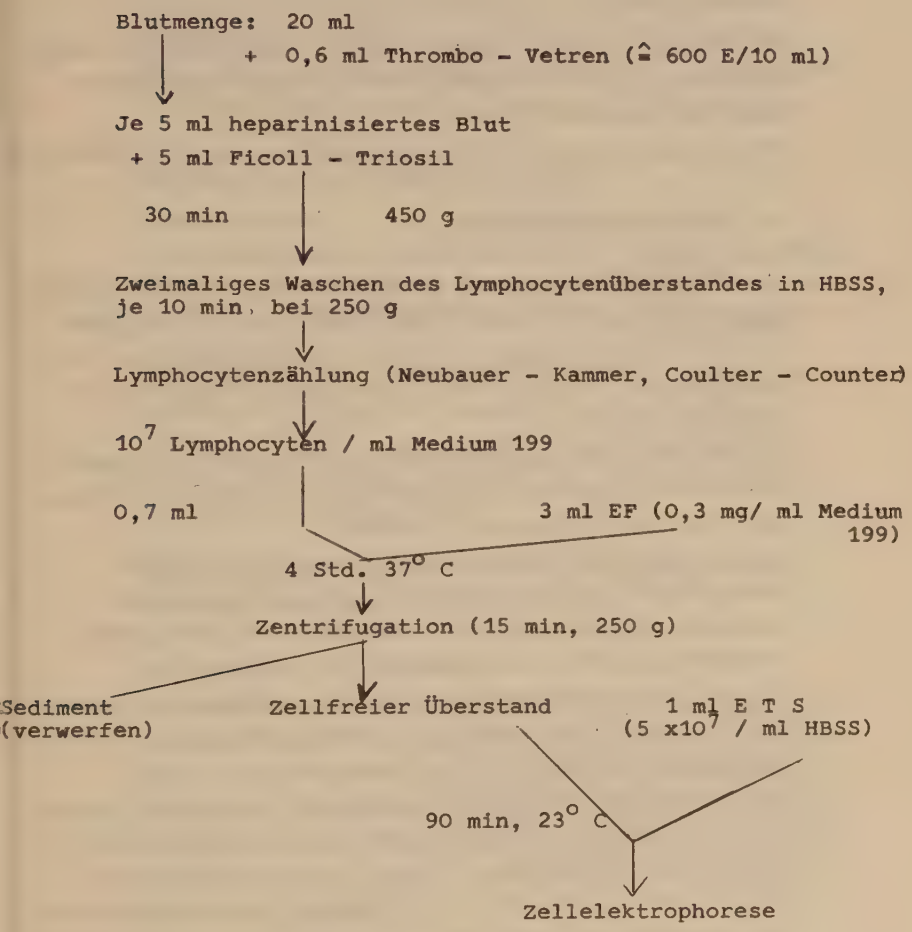
Zubereitung der tannierten und sulfosalicylsäurestabilisierten Hammelerythrocyten (Methode nach STAVITSKY 1954)

Gewaschene Hammelerythrocyten werden in einer mit Phosphat gepufferten Kochsalzlösung (PBS), die 1 % Polyvenylpyrolidon enthält, in einer Endkonzentration von 10 % suspendiert. Gleiche Volumina der Hammelerythrocytensuspension und Tanninsäure in einer Konzentration von 1/20000 werden 10 min lang bei 37° C inkubiert, die Zellen danach vorsichtig bei 125 g zentrifugiert und in PBS gewaschen. Danach wird das gleiche Volumen einer 1,5-prozentigen Sulfosalicylsäurelösung in 1-prozentiger PVP-PBS-Lösung tropfenweise unter Umrühren hinzugefügt. Dieser Vorgang soll ungefähr eine Stunde dauern und bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Die entstandene dunkelbraune Hammelerythrocytensuspension wird fünfmal in PBS gewaschen und danach in 0,9-prozentiger Kochsalzlösung resuspendiert, auf 5 x 10^8 Zellen/ml abgefüllt und bei 5° C gelagert.

Isolierung des "Encephalitogenen Faktors" (EF) (Methode nach DICKINSON und CASPARY 1973) (8)

Hirngewebe wird zunächst mit einer sterilen Schere (Skalpell) in kleine Stücke geschnitten und anschließend im Eisbad in einem Homogenisator weiter zerkleinert.
Das Homogenat wird in 4 vol. Aqua dest. suspendiert und bei 23000 g zentrifugiert.
Erneutes Suspendieren in 4 vol. NaCl und anschließendes 30-minütiges Zentrifugieren bei 23000 g.
Der in 4 vol. Aqua dest. resuspendierte Pellet wird gefriergetrocknet, danach im Verhältnis 1:10 mit einem Chloroform-Methanolgemisch (2:1) versetzt und anschließend 30 min gerührt. Danach erfolgt ein 10-minütiges Zentrifugieren bei 600 g. Der Überstand wird verworfen. - Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt.
Der Pellet wird luftgetrocknet, in 5 vol. NaCl 5 % suspendiert und 30 min lang bei 23000 g zentrifugiert.
Erneutes Verwerfen des Überstandes.
Unter Zugabe von n/100 HCl wird der in 5 vol. Aqua dest. resuspendierte Pellet auf eine pH von 3,5 eingestellt, 30 min lang leicht geschüttelt, 30 min lang bei 23000 g zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen.
Pellet und 5 vol. Aqua dest. werden durch n/10 HCl auf eine pH von 2,6 gebracht, 3 - 8 Stunden stehen gelassen und die Suspension danach 30 min lang bei 23000 g zentrifugiert.
Der Überstand wird aufbewahrt, der Pellet erneut mit n/10 HCl auf eine pH von 2,6 eingestellt.
Beide Überstände werden gegen Aqua dest. dialysiert und gefriergetrocknet.

Schematische Übersicht des Testansatzes für den Elektrophorese - Mobilitäts - (EM) Test



Probe	3 ml Überstand	+ 1 ml ETS
Nullstandard	3 ml HBSS	+ 1 ml ETS

b) Blutentnahme

10 bis 20 ml heparinisiertes Blut (0,3 ml Thrombo - Vetren der Fa. Promonta, Hamburg ≙ 600 E Heparin / 10 ml Blut).

Das Blut sollte möglichst sofort, höchstens aber zwei Stunden nach der Blutentnahme aus einer peripheren Vene verarbeitet werden.
Eine schnelle und sterile Verarbeitung ist erforderlich.

c) Lymphocytenisolierung

Je 5 ml heparinisiertes Blut werden mit 5 ml des Trennmediums Ficoll - Triosil in einem sterilen Polypropylen - Einmalröhrchen vorsichtig überschichtet. Danach erfolgt eine 30 min lange Zentrifugation bei 1800 Upm ≙ 450 g.

Aufgrund der unterschiedlichen Dichte der einzelnen Blutkörperchen führt die Zentrifugation zur Trennung der verschiedenen Zellarten:
Es erfolgt eine Sedimentierung der Erythrocyten, Granulocyten und Monocyten. In der Trennschicht zwischen Serum und Ficoll reichern sich die Lymphocyten als weißer Ring an.

Der weiße Lymphocytenring wird zunächst mit einer Pasteurpipette abpipettiert, danach werden die Lymphocyten 2 mal mit H B S S gewaschen:
Die Lymphocytensuspension von 10 ml Blut wird in ein steriles 10 ml - Polypropylenröhrchen gefüllt, mit H B S S aufgefüllt und 10 min lang bei 1200 Upm ≙ 250 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen, das Sediment mit ca. 4 ml H B S S in ein 5 ml - Polypropylenröhrchen gefüllt und erneut bei 1200 Upm ≙ 250 g 10 min lang zentrifugiert.

Danach erneutes Abgießen des Überstandes, Auffüllen bis auf 1 ml mit Medium 199 und vorsichtiges Mischen mit einer Pasteurpipette. Anschließend erfolgt die Lymphocytenzählung in einer Neubauer-Kammer beziehungsweise in einem Coulter-Counter. Die Lymphocytensuspension wird auf 10^7 Lymphocyten/ml $\hat{=}$ 7000 Lymphocyten/mm^3 Medium 199 eingestellt.

Inkubation der Lymphocyten mit EF

Ansatz (Probe):

0,7 ml Lymphocytensuspension (10^7 Lymphocyten/ml Medium 199)

+ 3,0 ml "Encephalitogener Faktor" (0,3 mg EF/ml Medium 199)

Die Probe wird 4 Stunden bei 37° C im unbegasten Brutschrank inkubiert, danach 15 min lang bei 1200 Upm $\hat{=}$ 250 g zentrifugiert und 3 ml des Überstandes abpipettiert und bei -20° C eingefroren bzw. sofort verarbeitet.

Im allgemeinen müssen die Proben innerhalb von 4 Wochen verarbeitet sein.

Vorbereitung zum Messen

Tannierte sulfosalicylsäurestabilisierte Hammelerythrocyten(E T S), auf 0,5ml abgefüllt, pro Abfüllung ca. 5 x 10^8 Erythrocyten, werden zweimal in H B S S gewaschen (jeweils 10-minütiges Zentrifugieren bei 1500 Upm $\hat{=}$ 300 g), danach im Coulter-Counter gezählt und auf 5 x 10^7 Erythrocyten/ml H B S S eingestellt.

Nullstandard (Kontrolle):

1 ml ETS (5 x 10^7 Erys/ml HBSS)
+ 3 ml Medium 199

Probe:

1 ml ETS (5 x 10^7 Erys/ml HBSS)
+ 3 ml Überstand

d) Zytopherometer

Das Zytopherometer ist ein Mikroskop, das zur Bestimmung der elektrischen Oberflächenladung suspendierter mikroskopischer Teilchen aufgrund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld dient. Die dazu benutzte Suspension befindet sich in der Meßkammer eines sogenannten Elektrophoresesystems. Da die Meßkammer senkrecht stehen muß, ist die optische Achse des Mikroskops horizontal angeordnet. Das Objektiv und die Temperierkammer müssen gut zueinander zentriert sein. Deshalb ist auf die Temperierkammer ein Justierkreis aufgetragen. Die Seitenlänge eines Feldes des Netzmikrometers entspricht einer Strecke von 16 nm.

Die Meßkammer befindet sich im Innern einer mit einem Umlaufthermostaten verbundenen Temperierkammer. Sie steht beiderseits über T - Stücke mit je einer unpolarisierbaren Platinelektrode in Verbindung. Durch zwei über die T - Stücke angeschlossene Schläuche erfolgt die Füllung, die Entleerung oder die Reinigung der Meßkammer. Das Gerät ist zur Kühlung der Meßkammer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Ein Konstantstromgerät versorgt die Elektroden mit Gleichstrom und hält den angelegten Strom konstant. Die Beobachtung der Wanderungsgeschwindigkeit erfolgt durch ein Phasenkontrastmikroskop unter 800 -facher Vergrößerung.

e) Messung im Zytopherometer

Nach 90- minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur (+ 23° C) werden die Wanderungszeiten der tannierten Hammelerythrocyten von Nullstandard und Probe in einem Zytopherometer (Firma Zeiss, Oberkochem) gemessen.

Nach Einschalten des Stromes wird die Laufzeit eines Erythrocyten durch ein Meßquadrat in der einen Richtung, nach Umpolen in der entgegengesetzten Richtung gemessen. Insgesamt wird je Zusatz die Laufzeit von 20 bis 25 Erythrocyten in beiden Richtungen gemessen.

Aus den Mittelwerten der Probe und des Nullstandards wird nach folgender Formel der Grad der Veränderung der elektrophoretischen Mobilität der Probe gegenüber dem Nullstandard gemessen.

Berechnung

1) Aktuelle Laufzeit $t = \frac{2\ a\ (b - a)}{b}$ sec

a = Laufzeit in 1. Richtung

b = Gesamtlaufzeit

2) Hemmung in % $= \frac{tp - to}{to} \times 100$

tp = Laufzeit der Erythrocyten der Probe

to = Laufzeit der Erythrocyten des Nullstandards

Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem Student - t - Test (38).

Die Messung erfolgte bis Januar 1978 mit einer Handstoppuhr, danach mit einer elektrischen Stoppuhr in Kombination mit einem elektronischen Tischrechner mit Ausgabeeinheit und Magnetband (Fa. Hewlett-Packard, HP-97).

Die Messungen wurden ausschließlich von einer Person durchgeführt, um mögliche technische Fehler gering zu halten.

2) E R G E B N I S S E

a) Lymphocytenzahlen aufgrund des Differentialblutbildes

Zur Bestimmung der Lymphocytenzahl des untersuchten Personenkreises führten wir Lymphocytenzählungen an Hand des Differentialblutbildes bei gesunden Kontrollpersonen und bei Patienten mit nicht malignen sowie mit malignen Erkrankungen (mit und ohne immunsuppressiver Therapie) durch. Es fanden sich bei:

-) Gesunden Kontrollpersonen: 3180 ± 1060 Lympho/mm^3 (n=29)
-) Patienten mit nicht malignen Erkrankungen: 2770 ± 1640 Lympho/mm^3 (n=79)
-) Patienten mit malignen Erkrankungen (ohne Therapie): 3100 ± 1550 Lympho/mm^3 (n=24)
-) Patienten mit malignen Erkrankungen (immunsuppressive Therapie): 1430 ± 910 Lympho/mm^3 (n=46)

b) Durchschnittliche Lymphocytenausbeute bei Gradientenzentrifugation mit Ficoll - Triosil in Relation zu der durch das Differentialblutbild zu erwartenden Lymphocytenzahl. (Abb. 1)

Zur Errechnung der mittels Gradientenzentrifugation gewonnenen Lymphocyten verglichen wir diese mit der aufgrund des Differentialblutbildes zu erwartenden Lymphocytenzahl. Die Lymphocytenausbeute betrug bei:

-) Patienten mit nicht malignen Erkrankungen: 71,5 %
-) Patienten mit malignen Erkrankungen (ohne Therapie): 62,8 %
-) Patienten mit malignen Erkrankungen (immunsuppressive Therapie): 50,4 %

Die Lymphocytenausbeute bei unter immunsuppressiver Therapie stehenden Patienten war also deutlich, bei unbehandelten malignen Erkrankungen wenig geringer als bei nicht malignen Erkrankungen.

c) Reinheit der durch Gradientenzentrifugation gewonnenen Lymphocytenpopulation

Nach 30- minütiger Gradientenzentrifugation mit Ficoll - Triosil bei 450 g und zweimaligem Waschen mit H B S S (je 10 min bei 250 g) untersuchten wir mikroskopisch bei gesunden Kontrollpersonen und bei Patienten mit malignen Erkrankungen (ohne und mit immunsuppressiver Therapie) die zelluläre Zusammensetzung der gewonnenen Lymphocytensuspension.

Es fanden sich bei:

) Gesunden Kontrollpersonen (n = 15)	Lymphocyten :93,9 ± 3,64% Granulocyten: 5,3 ± 2,82% Monocyten : 0,8 ± 0,94% Erythrocyten:36 pro 100 ausgezählte Leukocyte
) Patienten mit unbehandelten malignen Erkrankungen (n = 15)	Lymphocyten :85,4 ± 5,01% Granulocyten:12,4 ± 4,21% Monocyten : 2,2 ± 1,42% Erythrocyten:56 pro 100 ausgezählte Leukocyte
) Patienten mit immunsuppressiv behandelten malignen Erkrankungen (n = 15)	Lymphocyten :80,7 ± 8,00% Granulocyten:16,4 ± 6,62% Monocyten : 2,9 ± 1,87% Erythrocyten:84 pro 100 ausgezählte Leukocyte

Bei Patienten mit malignen Erkrankungen, besonders bei den unter immunsuppressiver Therapie stehenden, war die Lymphocytenausbeute im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen deutlich geringer. Ebenso war die Verunreinigung mit Erythrocyten sehr groß.

d) Vitalität der Lymphocyten

Die Vitalität der Lymphocyten wurde nach Gradientenzentrifugation mit Ficoll - Triosil (30 min, 450 g), zweimaligem Waschen in H B S S (je 10 min, 250 g), verschieden langer Inkubation bei 37° C mit E F und nach Gewinnung des Überstandes bei Zentrifugationsstärken von 250 g und 1500 g mit der Trypanblauprobe geprüft.

Patienten mit:

) Benignen Erkrankungen (n = 11)

Inkubationszeiten

	1/2	1	2	4 Std.
250 g	0%	0%	1%	2%
1500 g	4%	5%	12%	22%

Avitale Zellen in %

) Malignen Erkrankungen (ohne Therapie) (n = 10)

Inkubationszeiten

	1/2	1	2	4 Std.
250 g	1%	2%	5%	7%
1500 g	8%	11%	21%	56%

Avitale Zellen in %

) Malignen Erkrankungen (unter immunsuppressiver Therapie) (n = 11)

Inkubationszeiten

	1/2	1	2	4 Std.
250 g	3%	5%	8%	12%
1500 g	23%	30%	32%	63%

Avitale Zellen in %

Es zeigt sich eine deutlich erhöhte Vulnerabilität der Lymphocyten bei malignen Erkrankungen, insbesondere bei immunsuppressiv behandelten. Außerdem wird die Vulnerabilität der Lymphocyten mit zunehmender Inkubationszeit und Zentrifugationsstärke größer. (Abb. 2)

e) Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit von E T S im elektrischen Feld bei verschiedenen Inkubationszeiten von Lymphocyten mit E F

Zur Ermittlung der Relation zwischen verschieden langen Inkubationszeiten von Lymphocyten mit E F bei 37° C und dem Grad der Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit von E T S im Zytopherometer führten wir bei einem Malignompatienten (11- jähriger Knabe mit frischem, unbehandeltem Morbus Hodgkin, Stadium II b) Messungen der Wanderungsgeschwindigkeit der E T S nach Inkubationszeiten von 30 Minuten, 1 Stunde, 2 Stunden und 4 Stunden durch. (Abb. 3)

Es zeigte sich zwischen einer Inkubationszeit von 30 Minuten und einer Stunde eine relative Beschleunigungszunahme, zwischen einer Inkubationszeit von ein und zwei Stunden eine deutliche Hemmungszunahme der E T S gegenüber dem Nullstandard mit einem Hemmungsmaximum nach zwei Stunden.

Nach längeren Inkubationszeiten wurde keine weitere Hemmungszunahme der E T S beobachtet. Es kam zur Ausbildung eines Hemmplateaus.

Bei einer gesunden 13- jährigen weiblichen Kontrollperson kam es dagegen zwischen einer Inkubationszeit von ein und zwei Stunden zu einer raschen Beschleunigungszunahme der E T S mit einem Beschleunigungsmaximum nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden. War die Inkubationszeit länger als zwei Stunden, wurde keine Beschleunigungszunahme der E T S mehr beobachtet. Es kam hier ebenfalls zur Ausbildung eines Plateaus. (Abb. 3)

f) Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit von E T S im elektrischen Feld von der mit E F inkubierten Lymphocytenzahl

Es wurden Messungen der Wanderungszeit von E T S im Zytopherometer bei verschiedenen Lymphocytenzahlen von $0,1 \times 10^7$ bis $1,75 \times 10^7$ Lymphocyten nach vierstündiger Inkubation bei 37° C mit 0,9 mg E F in einer Verdünnungsreihe durchgeführt.

Bei dem umseitig angegebenen Malignompatienten kam es zwischen Lymphocytenzahlen von $0,3 \times 10^7$ und $0,7 \times 10^7$ zu einer deutlichen Hemmungszunahme der E T S, ein Hemmungsmaximum fand sich bei einer Lymphocytenzahl zwischen $0,7 \times 10^7$ und 1×10^7.

Höhere Lymphocytenkonzentrationen bewirkten keine weitere Hemmungszunahme.

Bei einer gesunden Kontrollperson fand sich dagegen eine kontinuierliche Beschleunigungszunahme der E T S mit zunehmender Lymphocytenzahl. (Abb. 4)

g) Wanderungsverhalten von E T S im Zytopherometer

α) Nullstandards (Leerwerte) bei Handstoppung und bei halbelektronischer Messung (Abb. 5)

Wir fanden im Vergleich zur Handstoppung mit der halbautomatischen Messung (elektronische Stoppuhr in Kombination mit einem elektronischen Tischrechner mit Ausgabeeinheit und Magnetband der Fa. Hewlett - Packard) eine deutlich geringere Standardabweichung der E T S:

Handstoppung: $4{,}74 \pm 0{,}40$ sec (n = 137)
Halbautomatische Messung: $4{,}89 \pm 0{,}18$ sec (n = 60)

β) Wanderungsverhalten von E T S einer einzelnen Probe (Tab. 3)

Zur Demonstration des Wanderungsverhaltens von E T S einer einzelnen Probe im Zytopherometer führten wir Messungen der Hin- und Rücklaufzeit, der aktuellen Laufzeit sowie der Differenz der Hin- und Rücklaufzeit bei einem 11- jährigen Knaben mit einem unbehandelten Morbus Hodgkin, Stadium II b, durch.

Es fanden sich bei 20 Messungen eine

mittlere Hinlaufzeit von	$5{,}04 \pm 0{,}46$ sec
mittlere Rücklaufzeit von	$5{,}64 \pm 0{,}38$ sec
aktuelle Laufzeit ($t = \frac{2a\,(b-a)}{b}$)	$5{,}30 \pm 0{,}25$ sec
mittlere prozentuale Abweichung zwischen Hin- und Rücklaufzeit von	$16{,}0 \pm 10{,}27$ %

Es kommt also bei einer einzelnen Probe zu deutlichen Unterschieden im Wanderungsverhalten von E T S. Dabei ist auffällig, daß die Rücklaufzeit der E T S meist wesentlich höher liegt als die Hinlaufzeit.

4) D I S K U S S I O N

a) Methodik
(siehe Tabelle 2)

α) Blutentnahme

Zur Gewinnung einer ausreichenden Lymphocytenzahl ist nach unseren Erfahrungen bei Gesunden, bei nicht malignen Erkrankungen sowie bei nicht immunsuppressiv behandelten malignen Erkrankungen eine Blutmenge von 10 ml ausreichend.

Es konnten mit dieser Blutmenge meistens zwei Proben verarbeitet werden.

Nach unseren Untersuchungen waren jedoch bei unter immunsuppressiver Therapie stehenden Patienten mit malignen Erkrankungen bis zu 20 ml Blut erforderlich, da bei ihnen bei relativ niedriger Lymphocytenzahl die Lymphocytenausbeute wesentlich geringer war.

LAMPERT und TAUTZ benötigen 15 - 20 ml (26,42), NITZSCHKE 20 ml (31), PORZSOLT 25 ml (32) und DOUWES sogar 30 ml Blut (11,12,13,14,16).

Die Blutentnahme erfolgte überwiegend aus einer Armvene in eine mit 0,3 ml (0,6 ml) Thrombo - Vetren benetzten 10 ml (20 ml) - Einmalspritze. Die Heparinmenge betrug also 60 E / ml Blut. Unter dieser Dosierung kam es niemals zu einer Gerinnselbildung, wenn das Heparin in der Spritze gut mit dem Blut durchmischt worden war und das Blut möglichst innerhalb von zwei Stunden verarbeitet wurde.

In der Literatur werden Angaben zwischen 20 und 50 E Heparin / ml Blut gemacht (16,21,26,27,31,37). Einige Autoren verwenden Heparin mit Konservierungsstoffen (16,26,31,37), andere zusatzfreies Heparin (17,27,40).

Da die Wirkungsweise dieser Konservierungsstoffe auf die Lymphocyten nicht bekannt ist und die Lymphocyten eventuell durch diese geschädigt werden, sollte nur reines Heparin verwendet werden.

Zu hohe Heparindosen können zu Interaktionen im Test führen (2).

Die zusätzliche Verwendung von E D T A zur Vermeidung von Lymphocytenverklumpungen (26,31,32,33) halten wir nicht für erforderlich. Auch ohne E D T A wurden Lymphocytenverklumpungen nicht beobachtet.

Einige Autoren defibrinieren das Blut mittels Glasperlen (17,24,27,29,36). Allerdings besteht hier durch zu kräftiges Schütteln die Gefahr der Haemolyse.

β) Isolierung der Lymphocyten

Zur Isolierung der Lymphocyten gibt es zwei Wege:
- Adhaesion der Granulo- und Monocyten an Nylon- bzw. Glaswolle oder an Eisenpartikel (Carbonyleisen- Methylzellulose- Methode) (8,9,10,17,18,19, 24,29,30,40).
-Zentrifugation des defibrinierten bzw. des heparinisierten Blutes durch einen Dichtegradienten (z.B. Ficoll-Triosil), wodurch sich die relativ schwereren Erythrocyten, Granulocyten und Monocyten absetzen (7,11,12,13,14,16,21,26,28,31,32, 33,34,36,37,41,42).

Bei TAUTZ wird eine vorherige Sedimentation der Erythrocyten mit Macrodex (Schering AG, Berlin) durchgeführt (42).

Bei uns erfolgte die Lymphocytenisolierung mittels Gradientenzentrifugation mit dem Flotationsmittel Ficoll-Triosil.

Im allgemeinen bildete sich ein regelrechter Lymphocytenring, wenn man darauf achtete, daß die Zytozentrifuge regelmäßig lief und die Zentrifugation nicht abrupt gestoppt wurde. War dies jedoch nicht der Fall, bildete sich nur ein unvollkommener Lymphocytenring. Es fanden sich dann meistens Lymphocytenverklumpungen im Ficoll, was einen Lymphocytenverlust bedeutete.

Das Zentrifugieren wird im allgemeinen 15 bis 30 Min. lang bei 250 bis 450 g durchgeführt (26,31,32,37,42). DOUWES zentrifugiert 15 Minuten lang bei 750 g (16). Bei uns erfolgte die Zentrifugation 30 Minuten lang bei 450 g (Tab. 2).

Die Lymphocytenausbeute mit dem von uns verwendeten selbstzubereiteten Ficoll-Triosil betrug im Mittel bei Gesunden 93,9 %, bei Patienten mit unbehandelten malignen Erkrankungen 85,4 % und bei immunsuppressiv behandelten Patienten mit malignen Erkrankungen 80,7 %, war also bei malignen Erkrankungen deutlich geringer als in der Literatur angegeben.

Bei TAUTZ fanden sich in der Lymphocytensuspension über 90 % (42), bei DOUWES sogar mindestens 97 % Lymphocyten (16) (Tab. 2). Die Kontamination der Lymphocyten mit Erythrocyten lag im Mittel bei 36 pro 100 ausgezählte Leukocyten bei Gesunden, 56 pro 100

ausgezählte Leukocyten bei unbehandelten und 84 pro 100 ausgezählte Leukocyten bei immunsuppressiv behandelten malignen Erkrankungen. Diese Kontamination könnte ebenso wie die Verunreinigung mit polymorphkernigen Granulocyten und Monocyten zu Interaktionen der Reaktionen führen.

Die von TAUTZ durchgeführte Macrodexsedimentation der Erythrocyten könnte die Zahl der kontaminierten Erythrocyten verringern (42).

Ein möglichst dreimaliges Waschen sowie eine zweimalige Gradientenzentrifugation könnte die Reinheit der Lymphocyten steigern, allerdings müßte ein weiterer Lymphocytenverlust hingenommen werden.

Zur Berechnung der Lymphocytenausbeute setzten wir die gewonnenen Lymphocyten in Relation zu der nach dem Differentialblutbild zu erwartenden Lymphocytenzahl. Es fand sich bei Gesunden und bei Patienten mit benignen Erkrankungen eine Lymphocytenausbeute von 71,5 %, bei Patienten mit unbehandelten malignen Erkrankungen von 62,8 % und bei Patienten mit malignen Erkrankungen, die unter einer immunsuppressiven Therapie standen, von 50,4 % (Abb. 1).

Die Lymphocytenausbeute bei unter immunsuppressiver Therapie stehenden Patienten war also deutlich geringer als bei benignen und unbehandelten malignen Erkrankungen.

Bei 11 von 90 Patienten = 12,2 % mit immunsuppressiv behandelten malignen Erkrankungen fand sich eine deutliche Verunreinigung des Lymphocytenringes: Der

Lymphocytenring war mit roten Koageln durchsetzt, so daß diese Proben wegen einer zu geringen Lymphocytenausbeute verworfen werden mußten.

Dagegen fand sich eine Verunreinigung des Lymphocytenringes nur bei 1 von 39 = 2,6 % gesunden Patienten und bei keinem Patienten mit benignen und unbehandelten malignen Erkrankungen.

Bei frischen lymphoblastischen Leukaemien fanden sich ebenfalls Koagelbildungen im Lymphocytenring. Diese Koagel stellten mikroskopisch Lymphoblasten dar. Im Sediment waren keine Lymphoblasten nachweisbar. Es konnten also alle Lymphoblasten im Lymphocytenring isoliert werden.

FISH bezeichnet die gewonnene Lymphocytensuspension als sehr heterogen (20). Er weist darauf hin, daß die Lymphocyten bei malignen Erkrankungen im Aufbau und biochemischem Verhalten deutlich von den Lymphocyten gesunder Personen variieren. Außerdem finde sich außer einem relativ großen Prozentsatz an polymorphkernigen Granulocyten, Monocyten und Erythrocyten andere nicht genau zu definierende Zelltypen sowie eine unbestimmte Anzahl von bereits vorgeschädigten Zellen, die bei einem Vitalitätstest noch nicht als avital zu erscheinen brauchen.

Unsere Versuchsserie der Vitalitätsprüfung nach verschieden langen Inkubationszeiten und bei verschiedenen Zentrifugationsstärken bestätigt die erhöhte Vulnerabilität der Lymphocyten bei malignen Erkrankungen.

γ) Optimale Inkubationszeit der Lymphocyten mit dem "Encephalitogenen Faktor"(EF)

Nach FIELD soll der "Makrophagen - Slowing Faktor" (M S F) innerhalb einer 90- minütigen Inkubationszeit der Lymphocyten mit E F bei 37° C freigesetzt werden (17). PORZSOLT beobachtete bei einer Inkubationszeit der Lymphocyten mit E F von 30 bis 60 Minuten eine deutliche Hemmungszunahme der E T S im elektrischen Feld bei malignen Erkrankungen mit einem Hemmungsmaximum nach 60- minütiger Inkubation (32), NITZSCHKE nach 4- stündiger Inkubation bei 37° C (31).

Wir fanden eine kontinuierliche Hemmungszunahme der E T S im elektrischen Feld nach Inkubationszeiten zwischen ein und zwei Stunden bei 37° C. Ein Hemmungsmaximum fand sich nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden. Bei länger dauernden Inkubationszeiten wurde keine Hemmzunahme der E T S mehr beobachtet.

Im Gegensatz dazu fand PORZSOLT bei gesunden Kontrollpersonen mit zunehmender Inkubationszeit eine zunehmende Beschleunigung der E T S im elektrischen Feld (32).

Dieses konnte durch unsere Untersuchungen bestätigt werden; es fand sich in den ersten beiden Inkubationsstunden der Lymphocyten mit E F eine kontinuierliche Beschleunigung der E T S im elektrischen Feld. Allerdings wurde bei uns im Gegensatz zu PORZSOLT ein Beschleunigungsmaximum nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden erreicht.

Aus diesen Untersuchungen kann geschlossen werden, daß die von den T- Lymphocyten bewirkte Produktion des M S F nach 30- minütiger Inkubation der Lymphocyten mit E F beginnt und nach etwa zwei Stunden abgeschlossen sein dürfte. Deshalb sollte unserer Meinung nach die Inkubationszeit der Lymphocyten mit dem "Encephalitogenen Faktor" bei zwei Stunden liegen.

ℓ) Optimale Konzentration des"Encephalitogenen Faktors" (E F)

E F - Verdünnungsreihen haben gezeigt, daß die optimale E F - Konzentration bei 0,3 mg/ml Medium liegt (16,32,42).

Bei dieser Konzentration soll sich kein direkter Einfluß von E F auf E T S finden. Bei niedrigeren Konzentrationen wandern E T S wegen ihrer negativen Überschußladung zur Anode, bei höheren Konzentrationen wegen einer positiven Überschlußladung zur Kathode.

SHENTON betont, daß E F nur bei hohen Konzentrationen einen direkten toxischen Effekt auf E T S bewirkt (40).

Während wir anfangs gute Ergebnisse mit dem E M - Test erzielten (37), erkannten wir zwischenzeitlich keine signifikanten Unterschiede im Wanderungsverhalten der E T S zwischen malignen und nicht malignen Erkrankungen, ohne daß wir zunächst eine Ursache dafür finden konnten. Eine Untersuchung der hergestellten E F - Suspension zeigte schließlich, daß diese nur minimale Konzentrationen an E F enthielt. Es fand sich bei weitem nicht die erforderliche Konzentration von 0,3 mg/ml Medium. Es stellte sich heraus, daß das uns freundlicherweise von Prof. Dr. AX, Behringwerke Marburg, zur Verfügung gestellte E F nur sehr schwer in Lösung zu bringen war. Nachdem nachweislich die erforderliche E F-Konzentration vorhanden war, konnten wir wieder gut reproduzierbare Ergebnisse erzielen. Aufgrund persönlicher Mitteilungen von Prof. Dr. LAMPERT, Gießen, erfuhren wir, daß dort zwischenzeitlich die gleichen Schwierigkeiten bestanden haben sollen.

ε) Optimale Lymphocytenzahl

CARNEGIE fand im M E M - Test eine deutliche Relation zwischen Anzahl der Lymphocyten und Grad der Hemmung der Wanderungsgeschwindigkeit der als Indikatorzellen verwendeten Meerschweinchenmakrophagen. (5).

SHENTON konnte dies bei einer Vergleichsstudie zwischen M E M - und E M - Test bestätigen (40).

Wie von PORZSOLT 1975 vorgeschlagen (32), werden bei der Durchführung des E M - Tests von den verschiedenen Autoren zwischen $0,5 \times 10^7$ und 1×10^7 Lymphocyten mit E F inkubiert (Tab. 2).

Wir fanden bei 4- stündiger Inkubation bei 37° C von verschiedenen Lymphocytenkonzentrationen mit E F eine deutliche Hemmungszunahme der E T S im elektrischen Feld bei Lymphocytenzahlen zwischen $0,3 \times 10^7$ und $0,7 \times 10^7$ Lymphocyten. - Eine maximale Hemmung der E T S fand sich bei einer Lymphocytenzahl zwischen $0,7 \times 10^7$ und 10^7 Lymphocyten (Abb. 4).

ζ) Probleme des Zytopherometer

Die Messung der Wanderungsgeschwindigkeit der Hammelerythrocyten wurde in einem Zytopherometer der Firma Zeiss, Oberkochem, durchgeführt.

Vor Meßbeginn wurde zunächst E T S in Medium gemessen, um das Wanderungsverhalten der E T S zu beurteilen. Liefen die Hammelerythrocyten gleichmäßig, wurde zunächst ein Nullstandard gemessen. Danach wurde E T S nach 90 Minuten langer Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Überstand der mit E F inkubierten Lymphocytensuspension vorsichtig mit einer

Spritze in die Meßkammer eingefüllt, um die Bildung von Luftblasen zu verhindern.

Vor Beginn einer Messung mußten die Hammelerythrocyten ruhig im Sichtfeld stehen. Bestand ein Abdriften oder nach Einschalten des Stromes ein nicht gleichmäßiges Laufen, mußte nach Luftblasen im Meßsystem gesucht werden. Diese traten gehäuft bei nicht genügend gereinigter Meßkammer, bei nicht dichten Membranen und bei bakterieller Verunreinigung des Meßmediums auf.

Das Auffinden der mitunter sehr kleinen Luftbläschen erforderte mitunter sehr viel Zeitaufwand, da diese sich meistens, nur für ein geübtes Auge sichtbar, in den Ecken ansammelten.

Der Meßvorgang einer Probe durfte den Zeitraum von 15 - 20 Minuten nicht überschreiten, da die Suspension nach diesem Zeitraum sauer wurde und es zu größeren Streubreiten beim Messen kam.

Normalerweise wurden die Messungen bei einer pH von 7,2 durchgeführt. Zur Kontrolle der pH des Mediums wurde diesem ein pH- Indikator beigefügt.

Es wurden nur Zellen gemessen, die scharf sichtbar waren, sich also in der stationären Ebene der Meßkammer befanden.

Die Zellen mußten einzeln laufen; sie durften nicht miteinander verklumpen.

Die Störanfälligkeit des Zytopherometers stellte uns oft vor große Probleme.

Mehrmals kam es zum Ausfall des Konstantstromgerätes; die zur Messung vorbereiteten Proben mußten verworfen werden.

Da das Zytopherometer an das Krankenhausstromnetz angeschlossen war, kam es bei Überbelastung des Stromnetzes zu großen Spannungsschwankungen, die die Meßergebnisse sehr beeinflußten. Das Gerät sollte deshalb an ein eigenes Stromnetz angeschlossen sein.

Mitunter kam es zum Auftreten von Kriechströmen; das Zytopherometer stand dann unter Strom, so daß die Arbeit am Gerät gefährlich werden konnte. Deshalb wurde von der Firma Zeiss ein Warnschild, das auf die Gefahren hinweist, herausgegeben.

Um ein einwandfreies Messen mit dem Zytopherometer durchzuführen, mußte das Gerät, insbesondere die Meßkammer, oft gereinigt werden, um Ablagerungen an der Meßkammerwand zu verhindern. Die Membranen mußten aus dem gleichen Grund oft gewechselt werden. Wurde dieses nicht beachtet, kam es, wie schon erwähnt, zur Ansammlung von kleinsten Luftbläschen, verbunden mit einem sehr unregelmäßigen Wandern der Indikatorzellen.

Die Messung erfolgte bis Januar 1978 mit einer Handstoppuhr. Danach erfolgte eine halbautomatische Zeitmessung mit einer elektronischen Stoppuhr, verbunden mit einem elektronischen Minicomputer (Hewlett-Packard HP-97) für Berechnung und statistische Auswertung.

Da oft stundenlange Messungen mit dem Zytopherometer bei Beobachtung der Indikatorzellen durch das Phasenkontrastmikroskop sehr ermüdend sind, beobachten einige Autoren diese auf einem Fernsehmonitor, der zusammen mit einer Fernsehkamera direkt an das Gerät angeschlossen ist (31,43). Dies hat allerdings den Nachteil, daß die Konturen der Indikatorzellen unscharf erscheinen und dadurch das Messen etwas ungenauer sein kann.

Ein E M - Test wurde nur als positiv bewertet, wenn die Meßergebnisse einer Probe von den Ergebnissen der Kontrollen differierten ($p \leq 0{,}05$ nach dem t - Test) und im Vergleich zum Nullstandard eine Hemmung der Wanderungsgeschwindigkeit der E T S aufwiesen.

Das Messen wurde fast ausschließlich von einer Person durchgeführt. Die Messungen erfolgten blind ; das heißt, Name und Krankheit des Patienten waren dem Untersucher nicht bekannt.

η) Nullstandard

Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß Überstände von Patientenlymphocyten ohne E F - Zusatz keinen eindeutigen Einfluß auf die Mobilität von E T S besitzen und sich in Medium gelöste E T S im Wanderungsverhalten gleich verhält (32,42), verwendeten wir als Kontrolle (Nullstandard) jeweils frisch angesetzte E T S ohne weiteren Zusatz.

Zunächst wurde pro Tag jeweils zu Beginn ein Nullstandard angesetzt. Auf diesen Nullstandard wurden alle Meßwerte eines Tages bezogen.

Es stellte sich allerdings heraus, daß mit zunehmender Meßdauer das Wanderungsverhalten der E T S variierte, so daß schließlich je zwei Proben ein Nullstandard gemessen wurde.

Nullstandard und Probe wurden jeweils 90 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Frühere Untersuchungen (40) haben gezeigt, daß dieser Zeitraum für die Reaktion von M S F mit E T S optimal ist und bei malignen Erkrankungen eine optimale Hemmwirkung auf E T S bewirkt wird.

ϑ) Wanderungsverhalten der E T S im Zytopherometer

Im Gegensatz zu LAMPERT (pers. Mitteilung), der eine im Vergleich zur Handstoppung größere Standardabweichung der Nullstandards mit der halbautomatischen Messung fand, war bei uns die Standardabweichung bei der halbautomatischen Messung deutlich geringer.

Sie betrug bei uns 4,89 $\pm$ 0,18 sec im Gegensatz zu 4,75 $\pm$ 0,40 sec bei der Handstoppung (Abb. 5).

Auch bei der Messung einer einzelnen Probe kam es zu deutlichen Schwankungen der Laufzeit der E T S, ohne daß wir dafür eine Ursache finden konnten.

Es fanden sich im Mittel Abweichungen in der Wanderungszeit von 15,96 $\pm$ 12,12 %. Dabei war auffällig, daß die Rücklaufzeit meist wesentlich höher lag. Wir konnten dies am Beispiel eines 11- jährigen Knaben mit einem unbehandelten Morbus Hodgkin, Stadium II b, zeigen, bei dem die durchschnittliche Zeitdifferenz zwischen Hin- und Rücklauf der E T S bei 16 % lag (Tab. 3).

Seit der Einführung des E M - Tests durch PORZSOLT ist man davon ausgegangen, daß E T S eine uniforme Population auch in Bezug auf das Wanderungsverhalten im elektrischen Feld darstellt (32).

Wir fanden dagegen doch deutliche Unterschiede im Wanderungsverhalten der Hammelerythrocyten im Zytopherometer, besonders bei malignen Erkrankungen.

Bei der Durchführung des M E M - Tests fordern mehrere Autoren wegen des unterschiedlichen Wanderungsverhaltens der Meerschweinchenmakrophagen eine Nichtberücksichtigung der Meßwerte, bei denen die Zeiten

für Hin- und Rückwanderung um mehr als 10 % differieren (18,22,35,36). Andere Autoren ziehen die Grenze bei 20 % (24,30).

In unserem Beispiel wären bei Nichtberücksichtigung aller Messungen mit Zeitdifferenzen $\leq$ 10 % nur 7 von 20 Messungen (= 35 %), mit Zeitdifferenzen $\leq$ 20 % 14 von 20 Messungen (= 70 %) im Meßergebnis berücksichtigt worden.

IRMSCHER ist jedoch der Meinung, daß alle Meßzeiten in das Ergebnis eingehen sollten, um einer eventuellen Manipulation vorzubeugen (24).

In der Literatur über den E M - Test ist nur wenig über das Wanderungsverhalten von E T S geschrieben worden. Wir sind der Meinung, daß die Messung von nur 10 Indikatorzellen (32,33,41,42) in den seltensten Fällen ausreicht, da der statistische Einfluß eines Meßwertes zu groß ist.

DOUWES mißt 15 Zellen (11,12,16), NITZSCHKE und LAMPERT mindestens 20 Zellen (25,31), wir 20 bis 25 Zellen.

b) Biochemische und immunologische Grundlagen

Über den biochemischen und immunologischen Wirkungsmechanismus des Tests ist bisher nur wenig bekannt. Der als Antigen verwendete "Encephalitogene Faktor" ist eine heterogene Substanz, die aus menschlichem Gehirn gewonnen wird. Der Wirkungsmechanismus zeigt Ähnlichkeiten mit dem aus Tumorgewebe gewonnenen "Cancer basic Protein" (C a B P)(4,5,6,8,17).

Nach DICKINSON soll C a B P eine 10^4 mal größere Antigenaktivität als Extrakte aus Normalgewebe haben (8). Ebenfalls von DICKINSON durchgeführte Untersuchungen zeigten für das C a B P ein Molekulargewicht von 16000 bis 18000. Es soll Proteolipideigenschaften besitzen, einen basischen Charakter haben und auf der Oberfläche der Tumorzellmembran lokalisiert sein. Die aktiven Fragmente sollen Peptidcharakter haben, das Molekulargewicht dieser Fragmente soll bei 4000 liegen (9,10). Entscheidend für die Antigenität soll eine Tryptophankomponente sein (10).

Weiterhin soll das C a B P bei Patienten mit malignen Erkrankungen bedeutend wirksamer sein als der E F (5,6,10,34,35).

Einige Autoren verwenden Extrakte aus verschiedenen Tumorgeweben (24,30). Sie weisen auf eine für bestimmte Tumortypen selektive Reagibilität hin. Diese tumorassoziierten Antigene (T A A) sollen für Malignome gleicher Histiogenese charakteristisch sein. Es wird von einem "immunologischen Tumorprofil" gesprochen. In der "DDR" wird ein "Antigenbesteck" mit fraktionierten Tumorantigenen chargenmäßig hergestellt. Damit sollen gute Ergebnisse erzielt werden können (24,30).

DOUWES berichtet über 86 % positive Testergebnisse bei Melanompatienten bei Verwendung eines Melanomextraktes (15). Eine Bestätigung dieser Befunde steht noch aus.

Nach FIELD können zur Leukaemiediagnostik durch Gefrieren und Auftauen abgetötete Leukaemiezellen als Antigen wirken und anstelle von E F als Testantigen mit Erfolg verwendet werden (19).

Die Verwendung von gereinigten Peptidextrakten des menschlichen Gehirns und von experimentell hergestellten Peptiden (Experimental Allergic Encephalogenic peptide = E A E der Beckman Laboratories, USA) zeigten negative Testergebnisse im M E M - Test (23).

Die als Antigene verwendeten Tumor - und Hirngewebsextrakte sollen bei vorher sensibilisierten T - Lymphocyten eine Mediatorsubstanz freisetzen, die in den Lymphocyten synthetisiert wird und die elektrische Beweglichkeit von Indikatorzellen im elektrischen Feld hemmt. Diese als Makrophagen - Slowing Faktor (M S F) bezeichnete Substanz soll mit dem Migrations - Inhibitions Faktor (M I F) identisch sein (3). Das Molekulargewicht liegt nach BLOCK und PREECE bei 23000 (3,34), nach PRITCHARD zwischen 8000 und 20000 (35) und nach SHENTON zwischen 13000 und 15000 (40).

Da die Hemmung der Wanderungsgeschwindigkeit von E T S im Zytopherometer bei Hinzufügen des Proteinsynthesehemmers Puromycin nicht nachweisbar ist, wird eine aktive Proteinsynthese der T - Lymphocyten bei der Bildung des M S F vermutet (32).

Trotz aller bisherigen Erkenntnisse ist es aber bisher noch nicht gelungen, die Art und den Aufbau der als Antigen bezeichneten Substanz zu erforschen.

Auch über die Wechselwirkung der als Antigen wirkenden Substanz mit den T - Lymphocyten weiß man heute noch sehr wenig, ebenso wie über die als Makrophagen - Slowing Faktor bezeichnete Mediatorsubstanz und deren Einfluß auf die Indikatorzellen.
FISH bezweifelt die immunologische Grundlage dieses Tests (20). Er ist der Meinung, daß die als E F bezeichnete Substanz mit den isolierten Zellpräparationen durch elektrostatische Anziehung in Wechselwirkung steht und durch Proteasen teilweise in Peptidfragmente zerlegt wird. Es wird vermutet, daß eines oder mehrere dieser Peptidfragmente die Wanderungsgeschwindigkeit der Indikatorzellen beeinflußt.

RAWLINS hält den M S F für ein Nekroseprodukt abgestorbener maligner Zellen (36).

c) Bisherige Ergebnisse mit dem E M - Test (Tab. 1)

TAUTZ erreicht eine Malignomtrefferquote von 88,3 % bei 111 Patienten (42), DOUWES von 84 % bei 167 Patienten (16), NITZSCHKE von 90,6 % bei 85 Patienten, PORZSOLT von 87 % bei 23 Patienten (32), RITTER allerdings nur von 53,8 % bei 39 Patienten (37).

In diese Ergebnisse werden aber auch Patienten eingeschlossen, die zum Zeitpunkt der Untersuchung unter immunsuppressiver Therapie standen.

Bei LAMPERT und NITZSCHKE waren die Ergebnisse bei Behandelten und Unbehandelten in etwa gleich positiv (26,31). DOUWES erreicht unter Ausschluß der unter immunsuppressiver Therapie stehenden, sich im Stadium der Tumorkachexie befindenden Patienten und von Patienten in länger als fünf Jahre andauernder Remission ein positives Ergebnis von 90,9 % bei 154 Patienten (16).

Unterschiedlich sind die bisher veröffentlichten Ergebnisse bei Leukosen. Während LAMPERT und NITZSCHKE ein positives Testergebnis von 94,8 % bei 38 Patienten mit A L L erreichten, die sich mit einer Ausnahme in haematologischer Remission befanden, aber noch überwiegend immunsuppressiv behandelt wurden (26,31), fand RITTER nur ein positives Testergebnis bei frischen, schon lange von der immunsuppressiven Therapie abgesetzten A L L - Patienten und bei A L L - Patienten mit einem frischen Rezidiv. Bei Patienten in haematologischer Remission, die unter einer immunsuppressiven Therapie standen, zeigte sich ein negatives Ergebnis (37). DOUWES konnte bei 8 untersuchten A L L - Patienten kein positives Ergebnis erzielen (12).

Die Wertigkeit des Tests wird dadurch eingeschränkt, daß auch bei einigen nicht malignen Erkrankungen der E M - Test positiv ausfällt.

DOUWES, LAMPERT, NITZSCHKE und TAUTZ beschreiben bei degenerativen neurologischen Erkrankungen (12,26, 41,42), LAMPERT und NITZSCHKE bei Autoimmunkrankheiten, insbesondere bei der Coeliakie, der Colitis ulcerosa und beim Morbus Crohn (25,26,31), sowie TAUTZ bei frischen Viruserkrankungen (42) positive Testergebnisse.

Wichtig ist der Zeitpunkt einer malignen Erkrankung, zu dem der Test positiv wird. Nach BAGSHAWE soll der Test schon bei Vorhandensein von 10^3 Tumorzellen, also im frühestem Stadium der Erkrankung, positiv ausfallen (2). Dies könnte einige falsch positive Ergebnisse bei nicht malignen Erkrankungen erklären. DOUWES und PORZSOLT fanden bei der Durchführung des E M - Tests auch bei Praecancerosen positive Testergebnisse (13,33). Die Frage, ob der Test zur Beurteilung eines Krankheitsverlaufes geeignet ist, wird von TAUTZ positiv beantwortet (42). Er findet bei nachuntersuchten Kindern, deren maligner Tumor vorher operativ entfernt worden ist, eine frühe Befundnormalisierung im E M - Test (42). Dies können DOUWES, PORZSOLT und RITTER nicht bestätigen (11,12, 13,14,16,32,37). Sie sind aufgrund ihrer Untersuchungen der Meinung, daß eine einmal positive Antwort wahrscheinlich über lange Zeiträume bestehen bleibt, der Test also zur Fragestellung eines Krankheitsverlaufes nicht geeignet ist.

Ebenfalls ungeklärt ist, ob eine immunsuppressive Therapie den Test beeinflußt.

NITZSCHKE und LAMPERT konnten keine unterschiedlichen Testergebnisse bei Behandelten und Unbehandelten feststellen (26,31), während DOUWES und RITTER fast ausschließlich bei Unbehandelten ein positives Testergebnis fanden (12,37).

Als Grund für den negativen Testausfall bei immunsuppressiv Behandelten sowie bei Patienten im Stadium der Tumorkachexie könnte ein nicht mehr optimal reagibles Immunsystem in Frage kommen (11,12,16,24,30).

Mit dem Elektrophorese - Mobilitäts - Test, einer Weiterentwicklung des Makrophagen - Elektrophorese - Mobilitäts (M E M-) Tests, scheint es gelungen zu sein, einen Test zur Malignomfrühdiagnostik gefunden zu haben, obwohl die biochemischen und immunologischen Mechanismen des Tests nicht geklärt sind.

Die widersprüchlichen Ergebnisse sind unserer Meinung nach auf die noch nicht ausgereifte Methodik (vgl. Tab. 2) und die Störanfälligkeit zurückzuführen.

Unser methodenkritischer Beitrag sollte auf die von Untersucher zu Untersucher unterschiedliche Durchführung des Tests hinweisen. Eine Standardisierung und Objektivierung der Messung ist dringend zu fordern. Zahlreiche variable Fakten gestatten keine Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Insbesondere sollte die Lymphocytenisolierung so schonend wie möglich durchgeführt werden. Um eine Kontamination mit Erythrocyten zu verhindern, sollte vor der Gradientenzentrifugation eine Sedimentation der Erythrocyten z.B. mit Macrodex durchgeführt werden. Die Gradientenzentrifugation sollte wiederholt werden, wenn die gewonnene Lymphocytenpopulation weniger als 90 % Lymphocyten enthält, auch wenn dadurch ein weiterer Lymphocytenverlust hingenommen werden muß.

Da es mit zunehmender Versuchsdauer zu einem zunehmenden Verlust an vitalen Lymphocyten kommt, sollte die Inkubationszeit der Lymphocyten mit E F zwei Stunden nicht überschreiten, zumal nach unseren Untersuchungen bei dieser Inkubationszeit die prozentuale Hemmung von E T S gegenüber dem Nullstandard und den Proben gesunder Kontrollpersonen am größten ist.

Das größte Problem stellt die Messung im Zytopherometer dar.

Wie wir zeigen konnten, kann es bei den Proben zu großen Schwankungen der Wanderungsgeschwindigkeit von E T S kommen. Wir führen dies auf die nicht zu verhindernden pH-,Temperatur- und Spannungsschwankungen in der Meßkammer während einer Meßdauer von ca. 10 Minuten zurück.

Eine Verbesserung der Meßbedingungen ist schon durch den Ersatz der Handstoppung durch eine halbautomatische Messung erzielt werden. Wir konnten dies durch Vergleich der Nullstandards bei Handstoppung und halbautomatischer Messung bestätigen. Bei der halbautomatischen Messung war die Standardabweichung der E T S deutlich geringer.

Ein weiterer Schritt ist die Durchführung einer vollautomatischen Messung mit konstanter pH, Temperatur und Spannung in der Meßkammer, bei der bis zu einhundert Indikatorzellen zur gleichen Zeit, also bei gleichen Versuchsbedingungen, gemessen werden können. Bei dieser Methode würden die Abweichungen der Wanderungsgeschwindigkeiten einzelner Indikatorzellen nicht so sehr in das Meßergebnis eingehen.

Bisher wurden nur relativ wenige Arbeiten über den E M - Test veröffentlicht, obgleich inzwischen in vielen Kliniken mit diesem Test gearbeitet wird.

Eine bessere Beurteilung über die Wertigkeit dieses Tests läßt sich erst dann durchführen, wenn alle Kliniken, die mit diesem Test Erfahrung gesammelt haben, ihre genaue Methodik und ihre Erfahrungen mitteilen.

C: Z U S A M M E N F A S S U N G

Der 1970 von FIELD und Mitarb. (17) zur Durchführung einer Malignomdiagnostik entwickelte Makrophagen - Elektrophorese - Mobilitäts - (M E M) Test wurde 1975 von PORZSOLT und Mitarb. (32) vereinfacht; dadurch bestand die Hoffnung, mit diesem Elektrophorese - Mobilitäts - (E M) Test eine Methode zur Malignomfrühdiagnostik gefunden zu haben. Bei diesem Test wird bei Patienten mit malignen Erkrankungen durch die Antigenwirkung eines aus menschlichem Gehirn (Encephalitogener Faktor = E F) bzw. aus menschlichem Tumorgewebe (Cancer basic Protein = C a B P) gewonnenen Faktors von T - Lymphocyten eine als Makrophagen - Slowing - Faktor (M S F) bezeichnete Mediatorsubstanz freigesetzt, die die elektrophoretische Beweglichkeit von tannierten und sulfosalicylsäurestabilisierten Hammelerythrocyten (E T S) im elektrischen Feld hemmt. Der Grad der Hemmung im Vergleich zu einem Nullstandard wird in einem Zytopherometer gemessen.

Ziel dieser Arbeit war es, auf Grund eigener Untersuchungen und unter kritischer Beurteilung der Literatur auf die Problematik des E M - Tests einzugehen.

Wir führten den E M - Test nach der von PORZSOLT (32) vorgeschlagenen Methodik bei 187 Personen, vorwiegend Kindern, insgesamt 264 mal durch (November 1976 bis Dezember 1978). Dabei kamen wir zu folgenden methodenkritischen Ergebnissen:

Reinheit der Lymphocytensuspension: Die mittels Gradientenzentrifugation mit Ficoll - Triosil gewonnene Lymphocytenpopulation zeigte eine Kontamination mit anderen Blutzellen. Im Mittel fanden sich bei Gesunden 93,9 $\pm$ 3,64 %, bei Patienten mit unbehandelten malignen Erkrankungen 85,4 $\pm$ 5,01 % und bei immunsuppressiv behandelten Patienten mit malignen Erkrankungen 80,7 $\pm$ 8,00 % Lymphocyten.

Vulnerabilität der Lymphocyten: Nach erfolgter Lymphocytenisolierung nahm die Vulnerabilität der Lymphocyten (Vitalitätstest mit der Trypanblauprobe) mit zunehmenden Zentrifugationsstärken und Inkubationszeiten zu. Im Gegensatz zu gesunden Kontrollpersonen war die Vulnerabilität der Lymphocyten bei malignen Erkrankungen, insbesondere unter immunsuppressiver Therapie, größer; dies gilt besonders bei hohen Zentrifugationsgeschwindigkeiten.

Es wird deshalb empfohlen, bei der Gewinnung des Überstandes Zentrifugationsstärken von 250 g nicht zu überschreiten und die Inkubationszeiten der Lymphocyten mit E F niedrig zu halten (s.u.).

Inkubationszeiten und Lymphocytenkonzentration: Bei einem Patienten mit unbehandeltem Morbus Hodgkin, Stad. II b, bei dem wir ausgiebige Messungen im Zytopherometer durchführten, kam es nach Inkubationszeiten von Lymphocyten mit dem "Encephalitogenen Faktor" (E F) zwischen ein und zwei Stunden bei 37° C zu einer deutlichen Hemmungszunahme der Wanderungsgeschwindigkeit der tannierten und sulfosalicylsäurestabilisierten Hammelerythrocyten (E T S) gegenüber dem Nullstandard im Zytopherometer. Ein Hemmungsmaximum fand sich nach einer Zeit von zwei Stunden. Die Inkubationszeit der Lymphocyten mit E F sollte deshalb auf zwei Stunden bei 37° C festgelegt werden. Wir fanden bei demselben Patienten eine deutliche Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindikgeit der E T S von der mit E F inkubierten Lymphocytenzahl. Zwischen Lymphocytenzahlen von $0{,}3 \times 10^7$/ml ($3000/mm^3$) und $0{,}7 \times 10^7$/ml ($7000/mm^3$) kam es zu einer kontinuierlichen Hemmungszunahme der E T S im elektrischen Feld. Ein Hemmungsmaximum fand sich zwischen $0{,}7 \times 10^7$/ml ($7000/mm^3$) und 1×10^7/ml ($10000/mm^3$). Deshalb sollte die bei dem Test verwendete Lymphocytenkonzentration zwischen $0{,}7 \times 10^7$ und 1×10^7/ml Medium liegen.

Messung im Zytopherometer: Das zur Messung der Indikatorzellen verwendete Zytopherometer der Firma Zeiss erwies sich als sehr störanfällig.

Die halbautomatische Meßmethode (elektrische Stoppuhr in Kombination mit einem elektrischen Tischrechner mit Ausgabeeinheit und Magnetband) hat den Meßvorgang etwas vereinfacht. Wir fanden in Relation zur Handstoppung eine wesentlich geringere Standardabweichung beim Nullstandard. Die Laufzeit der E T S lag bei der Handstoppung im Mittel bei 4,75 $\pm$ 0,40 sec, bei der halbautomatischen Messung bei 4,89 $\pm$ 0,18 sec.

Dennoch waren die stark differierenden Wanderungszeiten der E T S der einzelnen Proben auffällig. Die Rücklaufzeiten der E T S waren meist wesentlich länger als die Hinlaufzeiten. Die Differenz in den Wanderungszeiten lag im Mittel bei 15,96 $\pm$ 12,12 %. Bei einem angeführten Beispiel wären bei Nichtberücksichtigung aller Messungen mit Zeitdifferenzen $\leq$ 10 % nur 35 %, mit Zeitdifferenzen $\leq$ 20 % nur 70 % der Messungen im Meßergebnis berücksichtigt worden.

Es wird deshalb empfohlen, die Zahl der zu messenden Indikatorzellen so weit zu erhöhen, daß bei mindestens 20 bis 25 Zellen eine Differenz in den Wanderungszeiten von $\leq$ 10 % vorliegt, damit stärkere Abweichungen der Wanderungszeiten nicht so sehr in das Meßergebnis eingehen.

Wegen dieser trotz halbautomatischer Messung noch bestehenden technischen Schwierigkeiten wird ein vollautomatisches Meßverfahren für notwendig erachtet.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wird auf die bisher veröffentlichten Testergebnisse eingegangen und auf die noch nahezu ungeklärten immunologischen und biochemischen Vorgänge des Testablaufs hingewiesen.

Eine zukünftige Anwendung des E M - Tests als Tumor-Screeninguntersuchung bzw. zur Verlaufskontrolle maligner Erkrankungen erscheint uns nur sinnvoll, wenn die beschriebenen methodischen Schwierigkeiten beseitigt werden:

Wichtig ist vor allem eine Standardisierung des Testablaufes, insbesondere eine schonende Lymphocytenisolierung, eine Standardisierung der Inkubationszeiten von Lymphocyten mit E F und die chargenmäßige Herstellung eines gut löslichen E F - Präparates. Am dringlichsten erscheint jedoch die Einführung einer vollautomatischen Meßmethode, bei der innerhalb weniger Sekunden bei gleicher pH, gleicher Spannung und gleicher Temperatur des Meßmediums bis zu hundert Indikatorzellen gemessen werden können. Weiterhin ist zu fordern, daß alle Kliniken, die mit dem E M - Test arbeiten, ihre Erfahrungen und Ergebnisse mitteilen.

Unabhängig von den methodenkritischen Bemerkungen bestehen noch viele ungeklärte Fragen über den biochemischen und immunologischen Wirkungsmechanismus des Testablaufs.

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

A L L	Akute lymphatische Leukaemie
C a B P	Cancer Basic Protein
E D T A	Ethilendiamintetraacetate (Aethylendiamintetraessigsäure)
E F	Encephalitogener Faktor
E M - Test	Elektrophorese - Mobilitäts - Test
E T S	Tannierte und sulfosalicylsäurestabilisierte Hammelerythrocyten
H B S S	Hank's Balanced Salt Solution
I E	Internationale Einheiten
M A F	Makrophagenaktivierungsfaktor
M E M - Test	Makrophagen - Elektrophorese - Mobilitäts-Test
M I F	Makrophageninhibitionsfaktor
M S F	Makrophagen- Slowing Factor
P B S	Phosphat buffered salt solution
T A A	Tumorassoziiertes Antigen
T - Lymphocyt	Thymusabhängiger Lymphocyt
U P M	Umdrehung pro Minute

L I T E R A T U R N A C H W E I S

1) ARVILOUMMI, H., DALE, M.M., DESAI, H.N., MONGAR, J.L., RICHARDSON, M.
Failure to obtain positive MEM - Tests in either cellmediated immune conditions in the quinea-pig or in human cancer
Br. J. Cancer, 36, 545-549, 1977

2) BAGSHAWE, K.D.
Workshop on Macrophage Electrophoretic Mobility (MEM) and Structuredness of Cytoplasmatic Matrix (SCM) Tests
Br. J. Cancer, 35, 701-704, 1977

3) BLOCK, L.H., JAKSCHE, H., BAMBERGER, S., RUHENSTRODT-BAUER, G.
Identity of specific macrophage-active human lymphokines
Lancet, 718-719, 1978

4) CARNEGIE, P.R., CASPARY, E.A., FIELD, E.J.
Identification of a tumour-antigen
Biochem. J., 126, 5, 1972

5) CARNEGIE, P.R., CASPARY, E.A., FIELD, E.J., DICKINSON, J.P.
The Macrophage Electrophoretic Migration (MEM) Test for lymphocyte sensitization
Clin. exp. Immunol., 14, 37-45, 1973

6) CASPARY, E.A., FIELD, E.J.
Specific lymphocyte sensitization in cancer:
Is there a common antigen in human malignant neoplasia?
Br. Med. J., 2, 613-617, 1971

7) CROZIER, E.H., HOLLINGER, M.E., WOODEND, B.E., ROBERTSON, J.H.
An assessment of the Macrophage-Electrophoretic-Mobility-Test (MEM) in cancer diagnosis
J. clin. Path., 29, 608-609, 1976

8) DICKINSON, J.P., CASPARY, E.A., FIELD, E.J.
A common tumour specific antigen
Br. J. Cancer, 27, 99-105, 1973

9) DICKINSON, J.P., CASPARY, E.A., FIELD, E.J.
Localization of tumour specific antigen on external surface of plasma membrane
Nature new biologie, 239, 181-183, 1972

10) DICKINSON, J.P., CASPARY, E.A.
The chemical nature of cancer basic protein
Br. J. Cancer, 28, 224-227, 1973

11) DOUWES, F.R., MROSS, K.
Elektrophorese-Mobilitäts-Test in der Diagnostik von Malignomen
Z. Krebsforsch., 87, 281-290, 1976

12) DOUWES, F.R., HOFFMANN, W., MROSS, K., SPELLMANN, H.J.
Immundiagnostik maligner Erkrankungen. Der Elektrophorese-Mobilitäts-Test in der Diagnostik von Malignomen
Verhandl. der deutschen Gesellschaft für innere Med. 83, 793-801, 1977

13) DOUWES, F.R., HOFFMANN, W., MROSS, K.
Immundiagnostics of malignant diseases
The Electrophoretic Mobility Test in the diagnosis of gynecological malignancies
Oncology, 34, 80-83, 1977

14) DOUWES, F.R., HÜTTEMANN, U., MROSS, K.
Immundiagnostik maligner Erkrankungen
Der Elektrophorese-Mobilitäts-Test in der Diagnostik des Bronchialkarzinoms
Dtsch. Med. Wschr., 102, 419-422, 1977

15) DOUWES, F.R., SPELLMANN, H.J., MROSS, K.
Immundiagnostic of malignant disease
The Electrophoretic-Mobility-Test (EMT) in malignant melanoma
Oncology, in Druck , 1978

16) DOUWES, F.R.
Immundiagnostik maligner Tumoren
Schriftenreihe Krebsgeschehen, 11, 62-109, 1978

17) FIELD, E.J., CASPARY, E.A.
Lymphocyte sensitization. An in-vitro test for cancer?
Lancet, 1337-1341, 1970

18) FIELD, E.J., CASPARY, E.A., SMITH, K.S.
Macrophage Electrophoretic Mobility (MEM) Test in cancer:
A critical evaluation
Br. J. Cancer, 28, 208-213, 1973

19) FIELD, E.J., SHENTON, B.K., MEYER-RIENECKER, H.J.,
JENSSEN, H.L., KÖHLER, H., GÜNTHER, J.K., FRIEMEL, H.
Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts- (MEM) Methode.
Ihre Anwendung in der klinischen Immunologie
Dt. Gesundh.-Wesen, 30, 377-383, 1975

20) FISH, R.G.
Cancer detection with human peripheral lymphocytes:
A word of caution
Medical Hypotheses, 1, Nr. 4, 1975

21) FORRESTER, J.A., DANDO, P.M., SMITH, W.J., TURBERVILLE, C.
Failure to confirm the Macrophage Electrophoretic
Mobility Test in cancer
Br. J. Cancer, 36, 537-544, 1977

22) FRASER, H., HANCOCK, P.M.
An investigation of the Macrophage Electrophoretic
Mobility Test in the diagnosis of Scrapie in sheep
J. comp. path., 87, 267-274, 1977

23) GLAVES, D., HARLOS, J.P., WEISS, L.
The Macrophage Electrophoretic Mobility Test
Results on carcinoma of the colon and rectum
Int. J. Cancer, 19, 474-481, 1977

24) IRMSCHER, J., MÜLLER, M., FISCHER, R., OTTO, G., STRIEBEL, M.
Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts-Test (MEM) zur immunologischen Diagnose maligner Geschwülste
Dt. Gesundh.-Wesen, 30, 687-692, 1975

25) LAMPERT, F., NITZSCHKE, U., ZWERGEL, T.
Lymphocyte sensitization in childhood solid tumours and lymphoblastic leukaemia measured by Electrophoretic Mobility Test
Br. J. Cancer, 35, 844-849, 1977

26) LAMPERT, F., NITZSCHKE, U., ZWERGEL, T.
Lymphocyte sensitization measured by Electrophoretic-Mobility-Test in children with Crohnś and Coeliac disease
Lancet I, 141-142, 1977

27) LEWKONIA, R.M., KERR, E.J.L., IRVINE, W.J.
Clinical evaluation of the Macrophage Electrophoretic Mobility Test for cancer.
Br. J. Cancer, 30, 532-537, 1974

28) LIGHT, P.A., PREECE, A.W., WALDRON, H.A.
Studies with the Macrophage Migration Inhibition (MMI) Test in patients with malignant disease.
Clin. exp. Immunol., 22, 279-284, 1975

29) MEYER-RIENECKER, H., JENSSEN, H.L., KÖHLER, H., GÜNTHER, J., GUNDLACH, H.J.
Zur Anwendung des Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts-(MEM) Testes bei neurologischen Erkrankungen.
Klin. Wschr., 52, 288-292, 1974

30) MÜLLER, M., IRMSCHER, J., FISCHER, R., GROSSMANN, H.
Immunologisches Tumorprofil
Ein neuartiges Prinzip in der Anwendung des Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts (MEM)- Test zur differenzierten Karzinomdiagnose.
Dt. Gesundh.-Wesen, 30, 1836-1842, 1975

31) NITZSCHKE, U., ZWERGEL, T., LAMPERT, F.
Electrophoretic Mobility (EM)- Test for childhood cancer diagnosis
Europ. J. Pediat., 428, 1-11, 1977

32) PORZSOLT, F., MÜHLBERGER, G., AX, W.
Electrophoretic Mobility Test (EMT)
I. Modifications to simplify the detection of malignant diseases in man.
Behring Inst. Mitt., 57, 128-136, 1975

33) PORZSOLT, F., MÜHLBERGER, G., AX, W.
Electrophoretic Mobility Test (EMT)
II. Is there a correlation between the clinical diagnosis and immunologic test for precancerous diseases?
Behring Inst. Mitt., 57, 137-146, 1975

34) PREECE, A.W., LIGHT, P.A.
Further clinical investigations and studies on macrophage slowing factors.
Clin. exp. Immunol., 18, 543-552, 1974

35) PRITCHARD, J.A.V., MOORE, J.L., SUTHERLAND, W.H., JOSLIN, C.A.F.
Technical aspects of the Macrophage Electrophoretic Mobility (MEM) Test for malignant disease.
Br. J. Cancer, 28, I, 229-236, 1973

36) RAWLINS, G.A., WOOD, M.F., BAGSHAWE, K.D.
Macrophage Electrophoretic Mobility (MEM) with myelin basic protein.
Br. J. Cancer, 34, 613-618, 1976

37) RITTER, J., OEHME, J.
Erfahrungen mit dem Elektrophorese-Mobilitäts-Test bei Kindern. Eine diagnostische Hilfe in der paediatrischen Onkologie?
M`schr. Kinderheilk., 126, 556-560, 1978

38) SACHS, L.
Statistische Methoden
Springer Verlag, Heidelberg, 1972

39) SHENTON, B.K., HUGHES, D., FIELD, E.J.
Macrophage Electrophoretic Migration (MEM) Test for lymphocyte sensitization. Some practical experiences in macrophage selection.
Br. J. Cancer, 28, 215-223, 1973

40) SHENTON, B.K., JENSSEN, H.J., WERNER, H., FIELD, E.J.
A comparison of the kinetics of the Macrophage Electrophoretic Mobility (MEM) and the Tanned sheep Erythrocyte Electrophoretic Mobility (TEEM) Tests.
J. Immunol. Meth., 14, 123-139,1977

41) TAUTZ, Ch., LAIER, E., SCHNEIDER, W.
Der EM-Test, ein hochsensibler Malignomtest
Mschr. Kinderheilk., 125, 456-458, 1977

42) TAUTZ, Ch., SCHNEIDER, W., LAIER, E., BRÜGMANN, G.
Der Elektrophoretische-Mobilitäts-(EM) Test: Untersuchungsmethode zur Unterscheidung von malignen und nicht malignen Tumoren.
Klin. Wschr., 56, 175-185, 1978

43) ZWERGEL, T., NITZSCHKE, U., FRANKE, F., LAMPERT, F.
Improvements of the Electrophoretic Mobility Test to measure lymphocyte sensitization.
Microscopia Acta, 262, 1-5, 1978

Tabelle 1: Ergebnisse des Elektrophorese - Mobilitäts - (E M -) Tests bei den verschiedenen Autoren (Literatur)

(Positive Testergebnisse in %)

	DOUWES(16)	LAMPERT(26)	NITZSCHKE(31)	PORZSOLT(32)	RITTER(37)	TAUTZ(42)
Alle Malignome	14o/175 (8o%)	96/1o5 (91,4%)	113/123 (91,9%)	2o/23 (87%)	34/67 (5o,7%)	-----
Solide Tumoren	14o/167 (84%)	67/75 (89,3%)	77/85 (9o,6%)	2o/23 (87%)	21/39 (53,8%)	98/111 (88,3%)
Leukosen	o/8 (o%)	29/3o (96,7%)	36/38 (94,7%)	-----	13/28 (46,4%)	-----
Frische solide Tumoren	-----	-----	-----	-----	1o/1o (1oo%)	-----
Frische Leukosen	-----	1/6 (16,7%)	-----	-----	5/6 (83,3%)	-----
Solide Tumoren (immunsuppressive Therapie)	o/8 (o%)	-----	-----	-----	11/29 (37,9%)	-----
Leukosen (immunsuppressive Therapie)	-----	2o/21 (95,2%)	-----	-----	7/16 (43,8%)	-----
Nichtmaligne Erkrankungen	3/143 (2,1%)	6/45 (13,3%)	4/37 (1o,8%)	4/18 (22,2%)	3/54 (5,6%)	6/82 (7,2%)
Akute Virus-infektionen	-----	-----	-----	-----	-----	15/15 (1oo%)
Degenerative Nervenerkrankungen	3/3 (1oo%)	5/5 (1oo%)	-----	-----	-----	6/6 (1oo%)
Autoimmunkrankheiten	-----	-----	1o/11 (9o,9%)	-----	5/12 (41,7%)	-----

Tabelle 2: Methodik des Elektrophorese - Mobilitäts - (E M -) Tests bei den verschiedenen Autoren (Literatur)

	DOUWES (16)	LAMPERT (26)	PORZSOLT (32)	RITTER (37)	TAUTZ (42)
Blutmenge	3o ml	15-2oml	25 ml	1o ml	15-2o ml
Heparindosis	o,5 ml	Liquemin (5oE/ml)	nicht angegeben	Thrombo-Vetren(6oE/ml)	nicht angegeben
Zentrifugation:					
a) Lymphocytenisolierung	15',75o g	3o',4oo g	15',25o g	3o',45o g	25',25o g
b) Waschen	nicht angegeben	15',4oo g (3 x)	15',25o g (3 x)	1o',25o g (2 x)	15',25o g (3 x)
c) Gewinnung des Überstandes	15',25o g	15',8oo g	nicht angegeben	15',85o g	15',25o g
Lymphocytenausbeute	ca. 97%	-----	-----	-----	>9o%
Vitale Lymphocyten	> 9o%	-----	-----	-----	>95%
Lymphocytenkonzentration	$1o^7$/ml	$1o^7$/ml	$1o^7$/ml	$1o^7$/ml	5 x $1o^6$/ml
Menge der Lymphocytensuspension	o,7 ml	o,7 ml	o,7 ml	o,5 ml	1 ml
E F - Konzentration	o,3 mg/ml	o,3 mg/ml	o,3 mg/ml	o,3 mg/ml	o,3 mg/ml
Menge	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
ETS - Konzentration	5 x $1o^7$/ml	5 x $1o^7$/ml	5 x $1o^7$/ml	5 x $1o^7$/ml	5 x $1o^7$/ml
Menge	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Inkubationszeit E F - Lymphocyten	4 - 24 Std. 25°C	4 Std. 37°C	24 Std. Raumtemp.	4 Std. 37°C	24 Std. 37°C
Zahl der gemessenen Indikatorzellen im Zytopherometer	15	2o	1o	2o	1o

Tabelle 3: Wanderungsverhalten von E T S einer einzelnen Probe im Zytopherometer am Beispiel eines 11-jährigen Knaben mit einem unbehandelten Morbus Hodgkin, Stadium II b

Hinlaufzeit	Rücklaufzeit	Aktuelle Laufzeit ($t=\frac{2a(b-a)}{b}$)	Differenz	Abweich in %
4,4 sec	5,3 sec	4,81 sec	+ 0,9 sec	20,5 %
5,0 sec	5,6 sec	5,28 sec	+ 0,6 sec	12,0 %
5,8 sec	5,0 sec	5,37 sec	- 0,8 sec	13,8 %
4,4 sec	6,1 sec	5,11 sec	+ 1,7 sec	38,6 %
5,1 sec	5,8 sec	5,43 sec	+ 0,7 sec	13,7 %
5,2 sec	5,9 sec	5,53 sec	+ 0,7 sec	13,5 %
5,6 sec	6,0 sec	5,79 sec	+ 0,4 sec	7,1 %
4,6 sec	5,5 sec	5,01 sec	+ 0,9 sec	19,6 %
6,1 sec	5,5 sec	5,78 sec	- 0,6 sec	9,8 %
4,7 sec	6,2 sec	5,35 sec	+ 1,5 sec	31,9 %
5,4 sec	5,0 sec	5,19 sec	- 0,4 sec	7,4 %
4,6 sec	5,6 sec	5,05 sec	+ 1,0 sec	21,7 %
5,0 sec	5,4 sec	5,19 sec	+ 0,4 sec	8,0 %
5,3 sec	5,6 sec	5,45 sec	+ 0,3 sec	5,7 %
5,0 sec	5,6 sec	5,28 sec	+ 0,6 sec	12,0 %
5,4 sec	5,6 sec	5,50 sec	+ 0,2 sec	3,7 %
4,7 sec	6,4 sec	5,42 sec	+ 1,7 sec	36,2 %
5,0 sec	5,8 sec	5,37 sec	+ 0,8 sec	16,0 %
4,9 sec	5,1 sec	5,00 sec	+ 0,2 sec	4,1 %
4,6 sec	5,7 sec	5,09 sec	+ 1,1 sec	23,9 %
ittel ± 5,04 sec ± 0,46 sec	± 5,64 sec ± 0,38 sec	± 5,30 sec ± 0,25 sec		± 16,0 ± 10,27

Abb. 1 Durchschnittliche Lymphocytenausbeute in % bei Gradientenzentrifugation mit Ficoll - Triosil (30 min, 450 g) in Relation zu der durch das Differentialblutbild zu erwartenden Lymphocytenzahl.

a) Malignome (ohne Therapie)

b) Malignome (unter immunsuppressiver Therapie)

c) Benigne Erkrankungen

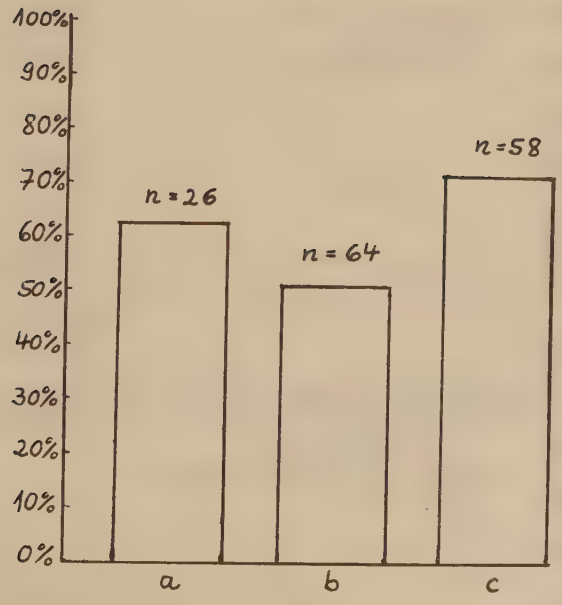


Abb. 2 Avitale Lymphocyten in % nach Gradientenzentrifugation mit Ficoll - Triosil (30 min, 450 g) zweimaligem Waschen in HBSS (je 10 min, 250 g) und verschieden langer Inkubationszeit mit EF bei 37° C und nach Gewinnung des Überstandes bei Zentrifugationsstärken von 250 g und 1500 g

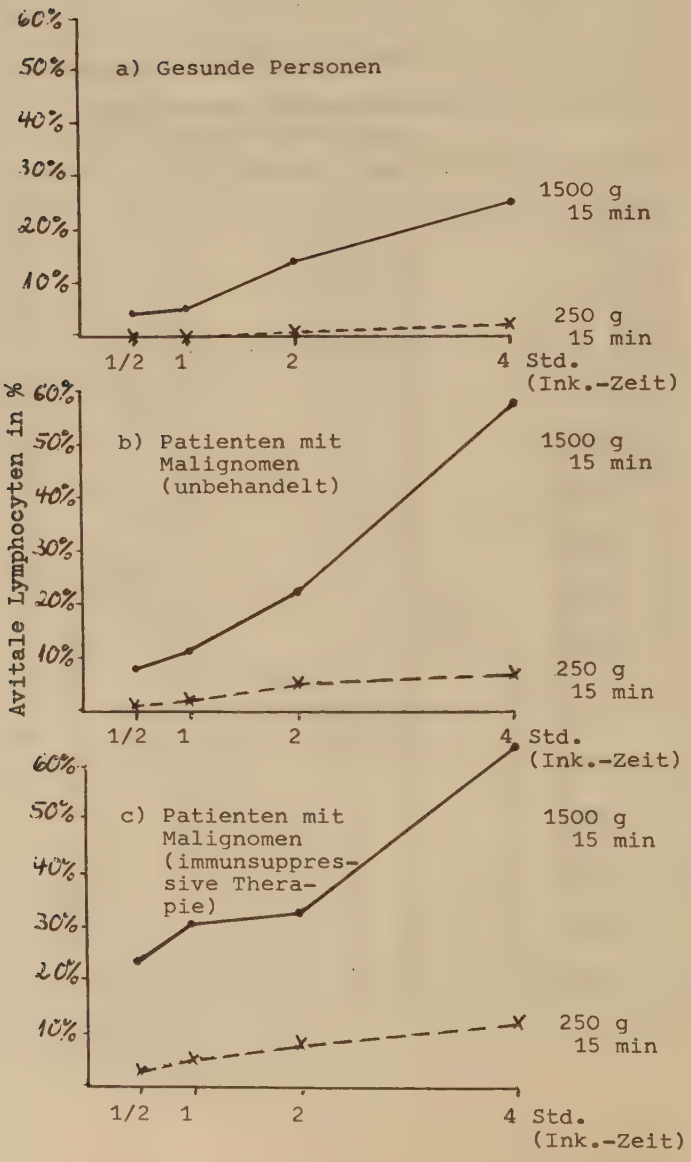


Abb. 3 Prozentuale Hemmung (Beschleunigung) von ETS nach verschieden langer Inkubationszeit von Lymphocyten mit EF bei 37° C im Vergleich zum Nullstandard

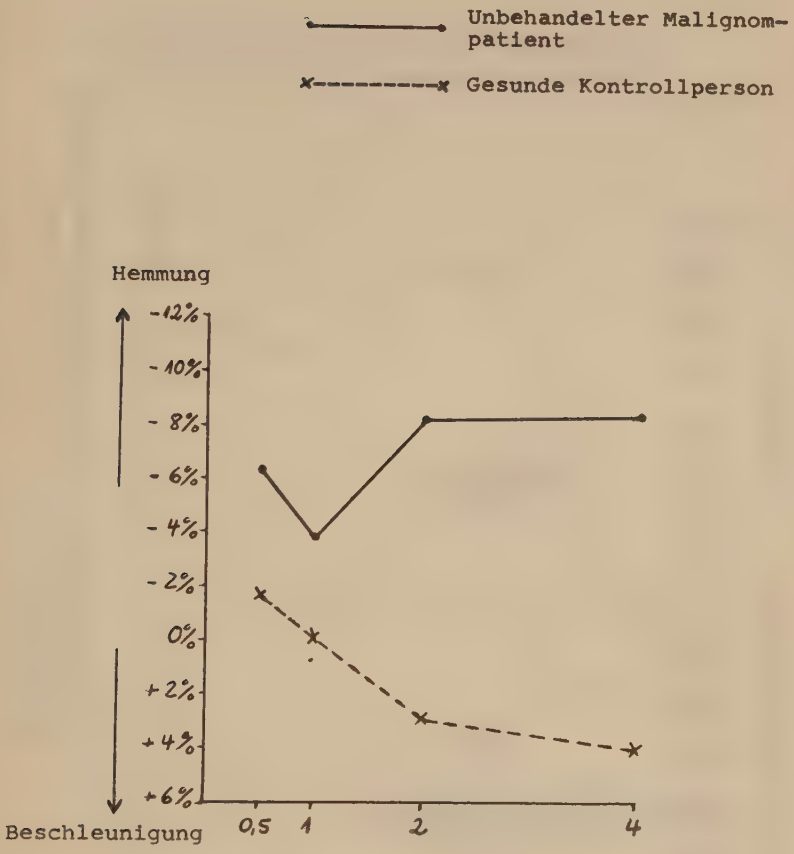


Abb. 4 Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit von ETS (prozentuale Hemmung oder Beschleunigung im Vergleich zum Nullstandard) von der mit 0,3 mg/ml Medium EF inkubierten Lymphocytenzahl (4 Std., 37° C)

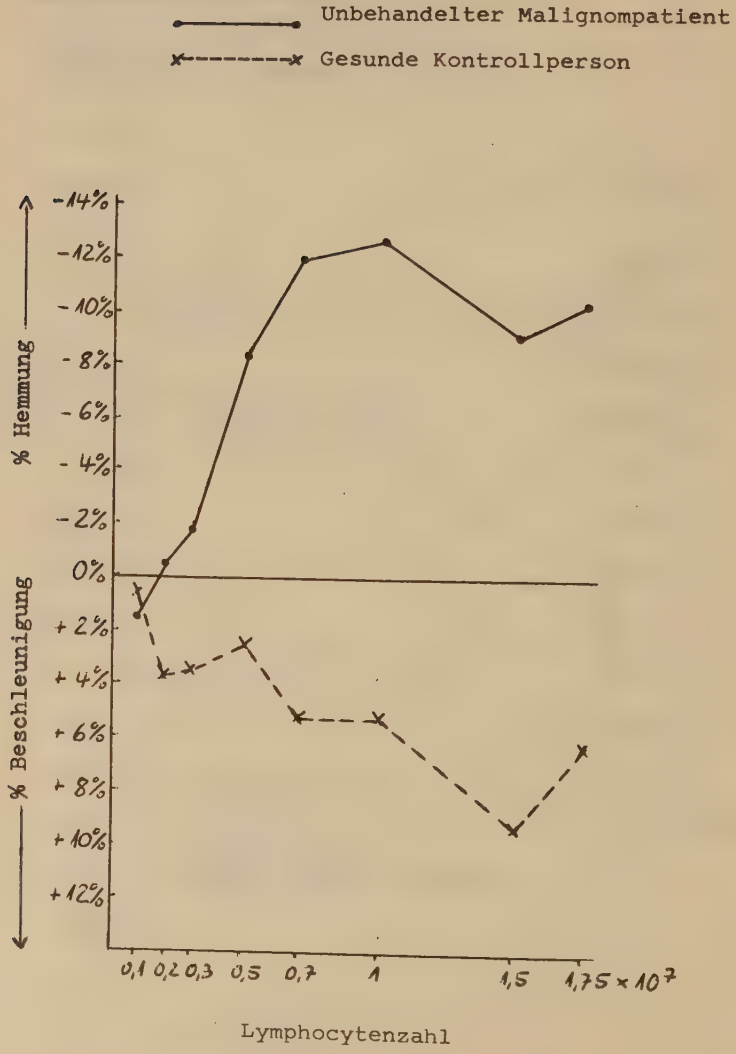
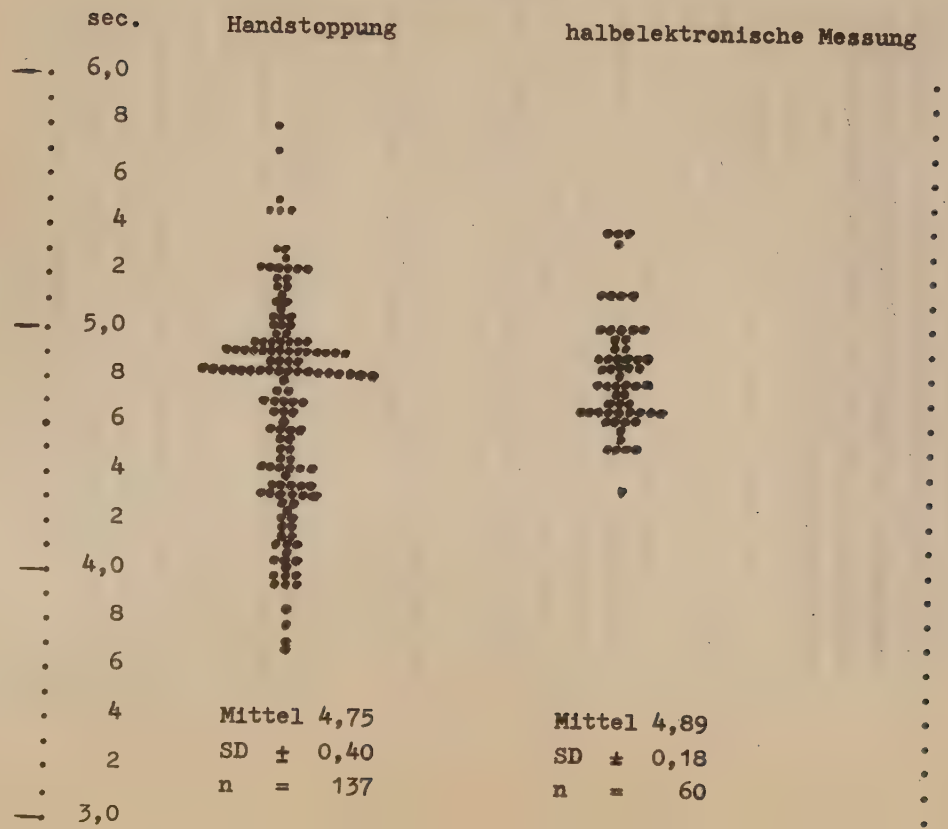


Abb. 5

Nullstandards (Leerwerte) im E M - Test
bei Handstoppung und halbelektronischer Messung



Herrn Prof. Dr. med. J. O e h m e danke ich für die Anregungen für diese Arbeit, für sein Interesse an ihrem Fortgang und die mir stets gewährte Unterstützung.

Herrn Dr. med. J. R i t t e r danke ich für die große Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch der medizinisch - technischen Assistentin Frau Wöltje für die labortechnische Assistenz und für die Durchführung der Messungen am Zytopherometer.

Lebenslauf

Am 18. Juli 1942 wurde ich, Dieter Hefke, als Sohn des Amtsarztes Dr. med. Karl Hefke und seiner Ehefrau Maria in Ostenburg/Ostpreußen geboren. Im Jahre 1944 siedelten wir nach Bad Bramstedt (Schleswig-Holstein) über und zogen im Frühjahr 1947 nach Eutin/Holstein, wo ich Ostern 1949 eingeschult wurde. Im Frühjahr 1963 legte ich im dortigen Johann Heinrich Voß- Gymnasium die Reifeprüfung ab. Von 1963 bis 1964 leistete ich die einjährige Wehrpflicht ab. Von 1964 bis 1972 studierte ich an den Universitäten im Hamburg, Kiel und Würzburg Medizin. Im Juli 1972 bestand ich an der Universität in Würzburg das medizinische Staatsexamen.
Nach einjähriger Medizinalassistentenzeit in Lübeck und Flensburg wurde mir am 30.9.1973 die Approbation als Arzt erteilt.
Danach war ich 6 Monate als Assistenzarzt in der Anaesthesieabteilung der ev. luth. Diakonissenanstalt in Flensburg (Ltd. Arzt: Dr. Lautenbach) tätig. Am 1. April 1974 begann ich die paediatrische Facharztausbildung in der Kinderklinik Holwedestraße (Ltd. Arzt: Prof. Dr. med. J. Oehme).

Im November 1974 heiratete ich meine Frau Ute geb. Meier. Im Mai 1975 wurde unsere Tochter Kerstin geboren.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten in Hamburg, Kiel und Würzburg:
Altmann, Bleichert, Blümcke, Büttner, Ehrengut, Fleischhauer, Franke, Haug, Henschler, Heyns, Horstmann, Jipp, Kern, Kühl, Kühn, Kühnau, Leydecker, Lierse, Löhr, Meyer, Naujoks, Neuert, Reichert, Röckl, Rütt, Schröder, Schwalm, Seeliger, Stöcker, Ströder, Wartenberg, Weiß, Witt und Wollheim.

Lebenslauf